

令和元年6月13日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03845

研究課題名(和文) しなやかでウェットな半立体マイクロ構造体の露光作製及び新規バイオチップへの応用

研究課題名(英文) Photolithographic fabrication of flexible and wet semi 3-D microstructure and its application to novel biochip

研究代表者

須丸 公雄 (Sumaru, Kimio)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・上級主任研究員

研究者番号：40344436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：ハイドロゲルシートからなる半立体マイクロ構造体を市販材料のみを用いて、フォトリソグラフィを通じた工程で作製する手法を確立した。また、十分な細胞接着性を付与することで、これらを足場とする新たな半立体細胞培養系の構築を実証した。さらに、光に鋭敏に反応して水溶性化する新規ポリマー材料を開発、細胞の選択剥離回収、特定細胞のオンプレート純化、パターンニングとそれに引き続く選択剥離、薬物リリースの時空間制御、半立体細胞組織体の構築など、光を用いた多彩な細胞プロセッシングを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新たに構築したしなやかな半立体細胞培養系は、平面固定培養と集塊浮遊培養の両方のメリットを併せ持ち、プラスチックやガラスなど、従来の硬質材料上での培養で失われてしまう組織特異的機能の維持が期待され、ヒト由来の培養細胞を用いたバイオアッセイの高精度化に貢献することが見込まれる。さらに、新たに開発された光応答性ポリマーは、細胞培養環境中で鋭敏な光応答水溶化を示すもので、細胞培養系をはじめとする種々のバイオシステムを光で自在に制御し、これまでにない高度な自動化や詳細な解析を可能にする重要な手段として、今後広く活用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The methodology to fabricate semi 3-D microstructures composed of hydrogel sheet was established on the basis of photolithographic process using commercialized materials only. By providing with sufficient adhesive property, it was demonstrated that semi 3-D cell culture system was constructed on the microstructures as culture scaffold. On the other hand, novel polymer materials which become water dissoluble in sharp response to light were developed. Using their thin layers, we demonstrated various cell manipulations such as selective collection of living cell from substrate, cell purification on plate, cell patterning and subsequent recovery, spatiotemporal control of drug release and construction of semi 3-D cell organoid.

研究分野：光応答性材料、細胞工学

キーワード：光応答ポリマー材料 ハイドロゲル フォトリソグラフィ 半立体構造 細胞培養足場 薬物リリース

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト iPS 細胞をはじめとするヒト幹細胞の具体的な活用が活発に検討されるのに伴い、バイオ・医療の研究現場から、細胞や組織の培養及びプロセッシングについて、これまでにない様々なニーズが挙がってきている。多くのヒト多能性幹細胞の未分化維持培養においては、通常の継代プロセスにおいて一貫して細胞を集塊の状態扱うことが求められ、細胞集塊のままの懸濁培養も一部検討されている。また、これら幹細胞を分化誘導して活用する際にも、細胞集塊の状態増殖させた胚様体を経る手法が多く用いられている。こうした細胞塊の状態を追跡評価して品質管理を行うには、それぞれに継続的にアクセスして、顕微鏡観察できることが極めて重要であるが、分散状態での培養では他の細胞塊に紛れてしまうため、そのような継続観察は極めて困難である。ハンギングドロップ法やマイクロウェル培養など、細胞集塊ごとに区分けして培養する手法も検討されているが、培養液の交換が不可能あるいは極めて困難であるなど、実際上大きな制約が存在する。マイクロ流体システムのバイオ用途への応用が進む中、流れる培養液中での細胞培養の検討も盛んに行われているが、培養基材に接着させた細胞への適用に限られるのが現状である。

申請者らは、光の精密パターン照射によってポリマー材料をオンデマンドに制御する技術の開発に長年取り組み、光機能性高分子の設計・合成・物性解析、材料プロセス、照射光学系の設計・製作といった幅広い分野の研究ポテンシャルを蓄積しつつ、研究開発を進めてきた。その中で、独自に開発した光酸発生ポリマーの薄層上で、水溶性ポリマーの架橋によるハイドロゲル膜形成と、基材表面からの立ち上がり剥離(“pop-up”)の両方を、光で誘起できることを見出した。そしてこの知見に基づき、全く新しい「ものづくり」の方法論を検討、半透性ハイドロゲル膜からなり、2次元と3次元の両方の長所を併せ持つ「半立体」マイクロ構造体群を、半導体LSI製造に用いられるフォトリソグラフィのプロセスを通じて作製できることを実証した。こうして作製されたマイクロ構造体はウェットかつしなやかで、樹脂やエラストマーからなるものよりも、ゲルからなる従来のレリーフ状のマイクロ構造体とも一線を画すものであった。

2. 研究の目的

そこでさらに、こうした新規マイクロ構造体に関する研究を発展させるべく、これまでにないバイオチップを創成することを本研究の目的とした。ポケット状のマイクロ構造体は、細胞集塊をしなやかなゲル膜で包み込んで整列保持、平面的にディスプレイすることが原理的に可能で、全数顕微鏡観察による量産細胞の品質管理や、フロー培養による薬物スクリーニングの浮遊細胞集塊への適用など、特にヒト由来細胞を用いたバイオアッセイへの展開が見込まれた。さらに、従来の樹脂製基材とは異なり、生体組織のような柔軟性を有し、酸素や栄養成分に対して高い透過性を有するこの構造体は、細胞培養の新たな足場となることが期待された。

3. 研究の方法

3. 1. 半立体マイクロ構造体からなる新規細胞培養系の構築

ハイドロゲルシートからなる半立体マイクロ構造体を、浮遊性細胞集塊の捕捉フロー培養系に応用するため、様々な形状を有する構造体を試作した。また、細棒集塊の捕捉特性は、ヒト iPS 細胞を用いて検討した。ハイドロゲルシートの架橋と剥離の両方を、異なるエリアで制御する上で、側鎖に光酸発生剤を有する polymethacrylate の特性を活用する手法をすでに確立していたが、この特殊なポリマーの合成には多数の工程を要し、こうした構造体を実用化する上でボトルネックの一つと考えられた。そこでこの構造形成手法を見直し、全て市販試薬を用いて実現する新規手法を確立すべく、パターン化犠牲層の分解を通じて後からハイドロゲル層を剥離するスキームを考案した。具体的には、犠牲層の構成材料として種々の親水性ポリマーを、ハイドロゲルの架橋や犠牲層の光パターン化手段として、市販の光酸発生剤、光ラジカル発生剤を検討した。さらに、接着底部からも栄養分及び酸素を供給可能な新規細胞培養足場に応用すべく、強い細胞接着阻害性を有するハイドロゲル膜への細胞接着性の賦与するため、ポリマーブレンドや架橋構造の改変、細胞接着性ポリマーのオーバーコートなどの検討を行った。

3. 2. 新規光応答性ポリマーの開発と細胞操作への応用検討

ハイドロゲルシートをエリア特異的に剥離する技術は、上述の半立体構造体の作製に加え、光で駆動するアクチュエータなどへの展開が考えられたが、エタノールと水の混合溶媒中での光照射を要し、それがバイオ分野への応用を考える上で大きな制限となっていた。そこで、主鎖としては poly(N-isopropyl acrylamide) ベースの構造、光応答性を有する側鎖構造として新たに o-nitrobenzaldehyde (NBA) を検討、光誘起水溶性を示す新規ポリマーの開発を試みた。さらに、開発したポリマーについて、詳細な光応答物性の解析及び光細胞操作や新規細胞培養系構築の検討を行った。

4. 研究成果

4. 1. 半立体マイクロ構造体からなる新規細胞培養系の構築

種々の構造を検討した結果、ハイドロゲルシートからなるメッシュポケット構造体を用いて、所定サイズ以上のヒト iPS 細胞の集塊を培養基材上にトラップできることを確認した。また、市販試薬のみを用いてマイクロ構造体を形成するスキームについて、まずはパターン化犠牲層として所定分子量の polyacrylic acid を市販のナフチルイミド型紫外応答性光酸発生剤で光架橋、未架橋域を除去後、ヒドロキシプロピルセルロース (HPC) を同様の光酸発生剤と酸触媒架橋剤を用いてパターン架橋した。これを水酸化ナトリウム水溶液に浸漬することで、犠牲層存在領域で架橋 HPC 層が剥離する一方で、それ以外の箇所ではポリスチレン表面にとどまる操作条件が見出された。こうして形成されたハイドロゲルシート表面は、極めて強い細胞接着阻害性を呈していたが、スチレン-無水マレイン酸の共重合体の溶液をコーティングするという簡便な手法で、所定の細胞接着性を付与することに成功、HeLa や MDCK といった株化細胞を、半立体構造体を足場として培養できることを確認した (図 1)。これらに比べて接着性に乏しい HepG2 については、さらにコラーゲンコートをした条件で、構造体上培養できる条件が見出された。以上により、平面固定培養と集塊浮遊培養の両方のメリットを併せ持つ新たな半立体細胞培養系の構築を実証した。

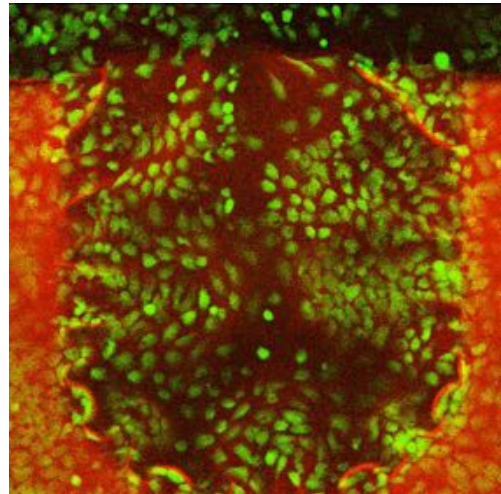


図 1 ハイドロゲルシートからなる半立体マイクロ構造体を足場とする HeLa 細胞培養系 (緑: HeLa、赤: ハイドロゲルシート)

4. 2. 新規光応答性ポリマーの開発と細胞操作への応用検討

光応答残基として NBA を含むモノマーを用いた共重合反応はほとんど進行しないことを確認した。そこで、NBA のアルデヒド基をアセタール保護したところ反応性が向上し、後から脱保護することで所望の共重合体 (図 2) を所定量得られることが確認された。物性解析の結果、このポリマーは、室温を含む幅広い温度範囲、中性を含む幅広い pH 範囲において水に不溶である一方で、光照射を行うと速やかに水溶化することが確認された。特に、NBA 含有量が 10 mol% の条件では、波長 365 nm の光をわずか 56 mJ/cm² で水溶化、極めて高い感度を有することが明らかになった。このポリマーからなる薄層は細胞接着性に富み、多くの株化細胞が伸展し、良好に増殖した。そこに光照射を行うと、速やかに細胞が剥離することを確認 (図 3)、これを用いて培養基材上の細胞を選択的に剥離回収、純化操作が行えることを実証した。また、細胞接着阻害性表面をベースとして、光でプレパターン溶解することで、パターン培養系を構築できること、そこから所定の箇所を光選択的に剥離回収できること、この原理を用いて細胞単層からなる半立体マイクロ構造体が構築できることを実証した。さらに、fluorescein diacetate や ionomycin などの薬剤をこのポリマーと混合してコーティングした培養基材では、細胞培養下で局所光照射を行うことで基材底面から薬剤をリリースし、任意のタイミングで任意の培養細胞に選択的に作用させられることを確認した。以上の結果から、この新規光応答性ポリマーが、光を用いた多彩な細胞プロセッシングを実現する上で有望な構成材料となることが強く示唆された。

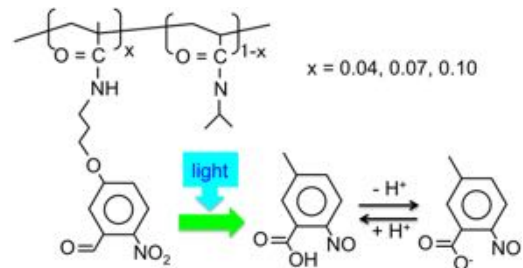


図 2 光水溶化ポリマーの構造と光反応に伴う構造変化

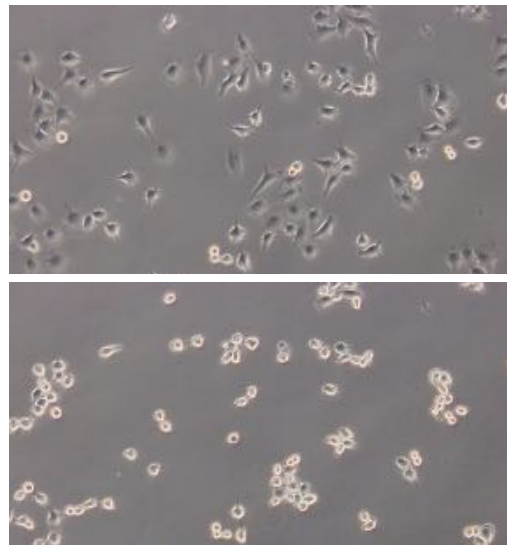


図 3 光水溶化ポリマー薄層の光溶解に伴う培養の剥離 (上: 照射前、下: 照射後)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

- ① K. Sumaru, K. Morishita, T. Takagi, T. Satoh, T. Kanamori “Sectioning of cultured cell monolayer using photo-acid-generating substrate and micro-patterned light projection” Eur. Polym. J. 93 (2017) 733-742
- ② K. Sumaru, K. T. Takagi, T. Satoh, T. Kanamori “Photo- and Thermoresponsive Dehydration of Spiropyran-Functionalized Polymer Regulated by Molecular Recognition” Macromol. Rapid Comm. (2017) 1700234
- ③ 須丸 公雄, 高木 俊之, 金森 敏幸 “細胞の自在操作を実現する新規光応答性ポリマー材料” 化学工業、2018, 579-584
- ④ K. Sumaru, T. Takagi, K. Morishita, T. Kanamori “Photoresponsive Aqueous Dissolution of Poly (N-Isopropylacrylamide) Functionalized with o-Nitrobenzaldehyde through Phase Transition” Biomacromolecules, 19(7) (2018) 2913-2922.
- ⑤ K. Sumaru, T. Takagi, K. Morishita, T. Satoh, T. Kanamori “Fabrication of pocket-like hydrogel microstructures through photolithography” Soft Matter 14(28) (2018) 5710-5714.
- ⑥ Y. Hayashi, J. Matsumoto, S. Kumagai, K. Morishita,... & K. Sumaru “Automated adherent cell elimination by a high-speed laser mediated by a light-responsive polymer” Commun. Biol. 1(1) (2018) 218

[学会発表] (計27件)

- ① 須丸 公雄 “Soft and Wet Systems Composed of Photoresponsive Polymer Materials”, 2th IUPAC International Conference on Novel Materials and their Synthesis, 長沙、2016年10月18日
- ② 須丸 公雄 “Photo-responsive polymer materials for biological applications” 3rd International Conference on Bio-based Polymers and Composites (BiPoCo2016), 2016年8月30日 他

[図書] (計2件)

- ① ソフトアクチュエータの材料・構成・応用技術, “光応答スピロピランゲルアクチュエータ”, 須丸 公雄, 高木 俊之, 杉浦 慎治, 金森 敏幸, S&T出版、(2016) 837-42
- ② アクチュエータの新材料, 駆動制御, 最新応用技術 “光で駆動するゲルアクチュエータ” 須丸 公雄, 杉浦 慎治, 高木 俊之, 金森 敏幸, 技術情報協会(2017)

[産業財産権]

○出願状況 (計4件)

名称：高分子化合物およびこれを用いた細胞操作方法
発明者：須丸公雄、高木俊之、金森敏幸、森下加奈
権利者：産業技術総合研究所
種類：特許出願
番号：特願 2016-11432
出願年：2016年
国内外の別：国内

名称：架橋ポリマー構造体およびその使用
発明者：須丸公雄、高木俊之、森下加奈、金森敏幸
権利者：産業技術総合研究所
種類：特許出願
番号：PCT/JP2016/062099
出願年：2016年
国内外の別：国外

名称：高分子化合物およびこれを用いた細胞操作方法
発明者：須丸公雄、高木俊之、金森敏幸、森下加奈
権利者：産業技術総合研究所
種類：特許出願
番号：PCT/JP2017/021332
出願年：2017年
国内外の別：国外

名称：架橋ポリマー構造体およびその使用
発明者：須丸公雄、高木俊之、森下加奈、金森敏幸
権利者：産業技術総合研究所
種類：特許出願
番号：特願 2018-104099
出願年：2018 年
国内外の別： 国内

○取得状況（計 1 件）

名称：架橋ポリマー構造体およびその使用
発明者：須丸公雄、高木俊之、森下加奈、金森敏幸
権利者：産業技術総合研究所
種類：特許登録
番号：特許第 6370996 号
出願年：2018 年
国内外の別： 国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：高木 俊之
ローマ字氏名：TAKAGI, Toshiyuki
所属研究機関名：国立研究開発法人産業技術総合研究所
部局名：創薬基盤研究部門
職名：主任研究員
研究者番号（8 桁）：10248065

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：森下 加奈
ローマ字氏名：MORISHITA, Kana

(3) 研究協力者

研究協力者氏名：露久保淳
ローマ字氏名：TSUYUKUBO, Atsushi

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。